

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Área Académica Agroforestal

Maestría en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción

**Trabajo Final de Graduación Sometido al Tribunal del Área Académica
Agroforestal del Tecnológico de Costa Rica para optar por el grado de Máster en
Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción**

**Determinación de la diversidad genética de germoplasma introducido
en Costa Rica con marcadores microsatélites del árbol de hule (*Hevea
brasiliensis* willd. Ex a. Juss) para el cultivo comercial**

Ing. David José Araya Gutiérrez

Cartago, Costa Rica

Diciembre, 2024



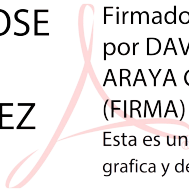
Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por el Tribunal del Área Académica Agroforestal del Tecnológico de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Máster en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción

Ing. Emmanuel Araya Valverde, M.Sc.
Profesor Tutor

Ing. Dawa Méndez Álvarez, M.Sc.
Profesora Lectora

Ing. Dagoberto Arias Aguilar, Ph.D
Presidente de Tribunal

DAVID JOSE
ARAYA
GUTIERREZ
(FIRMA)



Firmado digitalmente
por DAVID JOSE
ARAYA GUTIERREZ
(FIRMA)
Esta es una representación
gráfica y debe validar la firma

Ing. David José Araya Gutiérrez
Sustentante

Índice

Capítulo 1	1
Introducción	1
Problema de investigación y su importancia	3
Marco conceptual.....	5
Capítulo 2	10
Objetivos	10
Capítulo 3	11
Introducción	13
Metodología	15
Colecta de muestras.....	15
Selección de imprimadores.	17
Extracción de ADN	18
Amplificación por PCR Multiplex	18
Análisis de fragmentos	21
Análisis estadístico	22
Resultados y Discusión.....	22
Capacidad informativa de los microsatélites	22
Diversidad genética de <i>Hevea brasiliensis</i>	24
Estructura de <i>Hevea brasiliensis</i> en Costa Rica.....	25
Conclusiones	30
Declaraciones	31
Capítulo 4	32
Recomendaciones	32
Bibliografía	33

Índice de cuadros

Cuadro 1. Información de los sitios de colecta y cantidad de muestras provenientes de cada uno. Datos de Precipitación media anual y humedad relativa según el Sistema Nacional de Información Territorial.....	16
Cuadro 2. Imprimadores seleccionados para la amplificación por PCR Multiplex.	19
Cuadro 3. Tinción, concentración final y reacción múltiplex respectiva para cada uno de los microsatélites utilizados.	21
Cuadro 4. Estadísticas de diversidad genética estimadas para cada locus en la población de <i>Hevea brasiliensis</i>	23
Cuadro 5. Probabilidad de exclusión e identidad para el análisis con un número ascendente de marcadores microsatélite SSRs.	24
Cuadro 6. Estadísticas de diversidad genética estimadas para cada sitio en la población de <i>Hevea brasiliensis</i>	255
Cuadro 7. Distancia genética de Nei para los sitios de colecta de <i>H. brasiliensis</i> . A mayor valor, mayor distancia genética. Rojo, distancia nula; naranja, poca distancia; amarillo, distancia media; verde, alta distancia.	266

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación geográfica de los sitios de muestreo de individuos de <i>Hevea brasiliensis</i>	16
Figura 2. Gráfica de dispersión de BIC (bayesian information criterion) versus K (número de grupos apropiados para los datos).	26
Figura 3. Distribución filogenética de individuos muestreados por sitio y distribución en tres grupos, C1 (subgrupos A, B, C, D, E), C2 (subgrupos F, G, H), y C3. Los recuadros rojos y amarillos separan cada grupo, las líneas azules separan los subgrupos.	27
Figura 4. Análisis discriminante de componentes principales (ADCP) para 122 muestras de <i>H. brasiliensis</i> colectadas de 6 sitios distintos. DA eigenvalues, valores propios del análisis discriminante.	29

Capítulo 1

Introducción

El árbol de hule (*Hevea brasiliensis*) es una especie originaria de la región del Amazonas en Brasil, en la actualidad se cultiva principalmente en la región tropical de Asia, en países como Malasia, Indonesia, India, Sri Lanka, Tailandia, China, y Filipinas (Nair, 2020). En Mesoamérica un productor importante es Guatemala. Su principal forma de aprovechamiento es la extracción del látex natural, que a su vez se utiliza en la producción de caucho (López *et al.*, 2016). En cuanto a Costa Rica, según el Ministerio de Comercio Exterior, COMEX (2022), durante el 2019 la producción del sector caucho, que involucra la producción de plásticos y caucho, fue de \$313 000 000 y generó empleo para 12 183 personas, y según lo mencionado, es una industria para la que se espera observar un crecimiento en los próximos años.

Adicional a la producción de caucho, una vez que finaliza su ciclo productivo de látex, que puede tomar entre 30 y 37 años incluyendo un periodo de crecimiento inicial y posteriormente su etapa de mayor productividad (Balsiger, Bahdon y Whiteman, 2000), el árbol de hule presenta una madera con características apreciables para su aprovechamiento. De acuerdo con Owoyemi, Adamolekun y Aladejana (2018), la madera de árboles con 65 años posee una buena calidad con una estructura que hace posible que la madera se adapte bien a los aditivos utilizados en la industria maderera, brindando así una gran durabilidad.

Adicionalmente su potencial no se limita a la producción comercial de látex, según López *et al.* (2016), el cultivo de *Hevea brasiliensis* tiene otros usos, por ejemplo, en la mitigación del cambio climático, ya que posee un periodo de vida extenso durante el cual puede llegar a almacenar grandes cantidades de carbono fijado en el tronco, ramas y la sección aérea del árbol, siendo así que conforme más longevo sea, tendrá una mayor fijación total de C. Esto se complementa con lo mencionado por Zavala *et al.* (2019) quienes reafirman que la longevidad del hule influye en su efecto de fijación, pero también mencionan la posibilidad de implementar sistemas agroforestales que sean productivos y a la vez, contribuyan con la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero.

A pesar de los múltiples usos y formas de aprovechamiento de *H. brasiliensis*, el conocimiento sobre su diversidad genética no es extenso, aún siendo un cultivo adoptado por las regiones tropicales de Asia, África, y Latinoamérica. Este tipo de estudios se han realizado con clones de países como Brasil (Lima *et al.*, 2010), Guatemala (Silva, Oliveira y Campos, 2022), China, India, Sri Lanka, Malasia, e Indonesia (Saha, Bindu y Nazeer, 2005).

A partir del conocimiento generado se puede determinar información general, por ejemplo, en América, en un estudio realizado con genotipos de Guatemala y Brasil, se encontró una alta diversidad con estructura y estos datos fueron utilizados para una identificación efectiva de los clones, así como su certificación genética, además, los autores resaltan la utilidad de este tipo de estudios en programas de mejoramiento genético (Silva, Oliveira y Campos, 2022). Otro estudio realizado en China, en el que se observó una baja diversidad con la presencia de una estructura simple, tuvo la finalidad de construcción de un banco de germoplasma (Tian *et al.*, 2024). Sin embargo, la información existente sobre identificación genética no es suficiente para presentar certificaciones, registros genéticos o accesiones para una gran cantidad de variedades clonales (Silva, Oliveira y Campos, 2022). Esto no escapa de la situación en Costa Rica, en donde no se encuentran reportados artículos científicos o datos referentes a la identificación molecular y genética del árbol de hule.

A través del conocimiento que generan los estudios con marcadores moleculares se promueve el mejoramiento genético del cultivo, tradicionalmente este proceso se realiza por medio de selección recurrente; sin embargo, esto requiere de mucho trabajo y consume demasiado tiempo (Pootakham, Shearman y Tangphatsornruang, 2020). Los marcadores permiten realizar un proceso de mejora genética más dirigido que requiere de menos recursos y esfuerzo, ya que generan la posibilidad de seleccionar clones superiores para luego establecer lotes clonales con las características deseadas (Abu *et al.*, 2020).

Además, Trujillo *et al.* (2021), mencionan que la aplicación de técnicas moleculares de identificación es necesaria y de suma importancia para generar bases de datos de las

especies y variedades existentes, con lo que se promueve un mejor manejo de la biodiversidad que existe en las distintas zonas de estudio, y tener un mayor control de información para facilitar la protección de los ecosistemas.

Para realizar este procedimiento, se debe llevar a cabo la extracción del ADN de la especie de interés, que puede realizarse a partir de tejido de hojas y luego utilizar técnicas de amplificación de secuencias por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) multiplex, que es preferible debido a que presenta un menor costo y tiempo de ejecución, esto con el uso de microsatélites fluorocromados, cuyos productos pueden ser observados, entre otras técnicas, por medio de electroforesis capilar (Sánchez *et al.*, 2020)

En la actualidad, no se han realizado estudios con marcadores moleculares para identificación o caracterización genética de los clones traídos de Guatemala ni de plantaciones de *Hevea brasiliensis* presentes en Costa Rica. Dado el creciente interés en el cultivo de esta especie, es de gran importancia comenzar con los estudios de diversidad genética para poner a disposición de los productores y de la comunidad científica la información referente a la especie y que esta pueda ser aprovechada de la mejor manera para mejorar los sistemas productivos, a la vez que permite la utilización de los datos para continuar con el desarrollo científico en el campo de estudio.

Problema de investigación y su importancia

El presente trabajo busca completar un vacío de información y brindar herramientas para la caracterización e identificación molecular del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*) en Costa Rica, esto es de suma importancia debido a que la especie es la principal fuente de látex natural del mundo y es un cultivo que presenta potencial para ser un medio de reactivación económica en zonas rurales, gracias a la disponibilidad de un mercado definido y a las posibilidades de exportación del látex mediante empresas tractoras.

Adicionalmente, el ciclo de vida del cultivo del hule no implica la corta del árbol a corto o mediano plazo, y para la extracción del látex no se requiere de maquinaria ni esfuerzos excesivos por parte de los trabajadores. Además, a largo plazo cuando el ciclo productivo

de látex llega a su fin, la madera es aprovechable por lo que el árbol se utiliza en su totalidad. Con esto, el cultivo permite la implementación de sistemas o arreglos silvopastoriles que generen un mejor aprovechamiento de los suelos, así como un beneficio económico a los productores.

En Costa Rica, existieron dos momentos en que se dio gran importancia a la producción de hule natural, el primero de ellos a mediados del siglo XIX, en este período el interés nacional se dio hacia *Castilla elastica* mientras que en otros países de Sudamérica ya se utilizaba *Hevea brasiliensis*, de acuerdo con lo citado por Sell (2021). Según Van Der Laet (1911) para finales del siglo XIX ya había indicios de la superioridad en rendimiento y calidad de *H. brasiliensis* en comparación con *Castilla elastica*, lo que inevitablemente llevaría a un cambio en el sistema productivo del país.

El segundo momento se dio cerca de la década de 1940, donde se obtuvo germoplasma de *H. brasiliensis* con mayor resistencia a enfermedades y mejor rendimiento que fue cultivado y aprovechado, pero se mantenían en fincas experimentales (Bangham, 1942) siendo así que durante este último periodo se introdujo material de árbol de hule a Costa Rica.

Dado el interés internacional por la materia prima, durante los últimos años ha aumentado el interés en el cultivo del hule, siendo que Costa Rica está abriendo un camino hacia un tercer periodo productivo en el que se dispone de una mayor cantidad de tecnología e información, y es muy importante aprovechar esta disponibilidad de recursos para realizar estudios genéticos que puedan derivar en beneficios relacionados con la conservación de materiales cultivados hace décadas así como con la selección de genotipos altamente resistentes o productivos que puedan brindar mejor rendimiento y calidad.

Sin embargo, a pesar de la importancia del cultivo y los beneficios que presenta, en Costa Rica no se puede identificar con precisión el germoplasma (clones, variedades, razas locales, entre otras) del árbol de hule, por lo tanto, el problema de investigación para el proyecto fue responder a la pregunta ¿Qué variedades o clones hay disponibles en las distintas plantaciones de árbol de hule de Costa Rica?

La importancia de conocer esta información es que mediante esta identificación se podrían dirigir los esfuerzos para establecer nueva información de rendimiento y calidad con base en la caracterización del germoplasma, incluyendo los clones que actualmente se están utilizando. Esto permitiría generar información de manera sistemática que apoye los planes de cultivo y comercialización. También es importante mencionar que en aras de incrementar e incentivar el cultivo de hule, el conocimiento del germoplasma disponible es de gran relevancia para la investigación y el desarrollo en caso de que se busque implementar un programa de mejoramiento genético en el futuro. Además, considerando que el árbol de hule es una de las especies aprobadas por FONAFIFO para el programa de PSA, una identificación clara de los genotipos contribuye al establecimiento de plantaciones y cultivos con control genético

La implementación de los resultados de este trabajo responde a las necesidades planteadas en el objetivo de desarrollo sostenible (ODS) de la ONU número 15, vida de ecosistemas terrestres. En este sentido, el proyecto puede contribuir en aspectos incluidos en sus metas como la gestión sostenible de los bosques y la reforestación (meta 2), evitar la reducción de diversidad biológica (meta 5), mejorar el acceso y aprovechamiento de recursos genéticos (meta 6), incluir el uso de recursos y diversidad biológica en la planificación nacional para el desarrollo y la reducción de la pobreza (meta 9) (Naciones Unidas, 2015).

Marco conceptual

Hevea brasiliensis, o el árbol de hule por su nombre común, es una especie proveniente de la cuenca del Amazonas en Brasil, sin embargo, su producción se da en mayor medida en la región tropical de Asia, de manera que este árbol es la principal fuente de látex para la producción de caucho natural a nivel mundial (Nair, 2020).

Su distribución a nivel mundial desde el siglo XIX está asociada a la gran demanda de esta especie para la obtención de látex con fines de producción de caucho natural lo cual incentivó los procesos productivos y experimentales, además, durante este tiempo en Costa Rica se obtenía látex principalmente de *Castilla elástica* Van der Laet (1911), citado por Sell (2021). Luego, alrededor de la década de 1940 se da una fuerte introducción

para producción y experimentación con *Hevea brasiliensis* en Costa Rica (Bangham, 1942).

Además de su aprovechamiento en la extracción de látex natural, *Hevea brasiliensis* presenta características físicas y mecánicas en su madera que la convierten en un potencial producto al finalizar su ciclo productivo de látex, y de la misma manera, algunos estudios mencionan la relevancia que puede tener en cuanto a su implementación para la mitigación del cambio climático, e incluso se ha observado que conforme avanza el tiempo, presenta una mayor tasa de absorción de carbono (Owoyemi, Adamolekun y Aladejana, 2018; López *et al.*, 2016; Zavala *et al.*, 2019).

Adicionalmente, tal como mencionan Silva, Oliveira y Campos (2022), a pesar de los distintos usos como el aprovechamiento de su madera y las aplicaciones ambientales, existe una carencia en la cantidad de estudios genéticos realizados a la especie, principalmente al enfocar la atención hacia los distintos países de América Latina que cultivan el árbol de hule. Por lo anterior, es importante trabajar en torno a la identificación de la especie mediante herramientas moleculares y genéticas. En este sentido, el uso de microsatélites es un método que permite investigar la diversidad genética de las poblaciones del cultivo (Serra *et al.*, 2019).

En los estudios en diversidad genética se han realizado descripciones de germoplasma de *H. brasiliensis* utilizando individuos silvestres, provenientes de jardines clonales, o bien, provenientes de programas de mejoramiento. Lima *et al.*, (2010) analizaron 60 genotipos que clasificaron en 12 grupos y mencionan que individuos del Amazonas y los del Instituto Agronómico IAC de Brasil, fueron los que presentaron la mayor variación, esto en comparación con individuos de otras regiones de Asia.

Por su parte, Castro *et al.*, (2021) realizaron un estudio de diversidad asociada a 44 genotipos élite con características altamente productivas de Brasil y Asia, obteniendo una clasificación en seis distintos grupos. Además, de Souza *et al.*, (2015) describen a partir de un total de 1117 accesiones, que existen 99 que capturan la máxima diversidad

genética, y recomiendan a los programas de mejoramiento utilizar esta base de accesiones para implementar sus desarrollos.

Para poder realizar esto, es necesario seguir varios pasos, entre las metodologías para realizar el proceso se pueden mencionar etapas como la extracción de ADN, la amplificación de fragmentos de interés por medio de PCR utilizando imprimadores que aporten un marcaje fluorescente para posteriormente realizar un proceso de análisis de estas secuencias por medio de electroforesis capilar, lo que permite identificar distintos microsátélites al mismo tiempo y mediante análisis de los datos, diferenciar los genotipos de los individuos de la misma especie.

La extracción de ADN consiste en un proceso en el que se toma una muestra de tejido y mediante una lisis mecánica y química se libera el contenido celular, luego se realizan distintos procesos de lavado, limpieza y digestión enzimática, aprovechando características de los componentes celulares como tamaño, solubilidad y polaridad, lo que permite aislar ADN de alta concentración y pureza (Dairawan y Shetty, 2020) y este ADN es utilizado para la amplificación de fragmentos mediante PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa, como su nombre lo indica, consiste en la utilización de una enzima polimerasa y los mecanismos de replicación genética para la amplificación secuencial de fragmentos específicos de material genético, duplicando la cantidad obtenida con cada ciclo de reacción, lo que permite obtener de manera eficiente una gran concentración de los fragmentos objetivo (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Cada reacción de PCR requiere del uso de distintos reactivos como iones divalentes como el magnesio (Mg^{2+}), agregado usualmente como Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), coadyuvantes como el dimetilsulfóxido (DMSO), desoxirribonucleósidos trifosfato (DNTPs), soluciones buffer que mantienen condiciones adecuadas para el funcionamiento de la polimerasa, la Taq polimerasa que se encarga de catalizar la reacción, agua libre de nucleasas, el ADN molde e imprimadores, todo esto además del tiempo que toma la reacción (Bolívar, Rojas y García, 2014).

Una estrategia para la amplificación de regiones microsatélite es la técnica de PCR Múltiple, en la que se utilizan varios imprimadores que tengan temperaturas de alineamiento similares para poder utilizar un mismo programa de termociclado, distintos tamaños de amplificación para obtener una mayor cantidad de información y facilitar la distinción de uno u otro fragmento, así como el marcaje por fluorescencia que, al utilizar distintos marcajes también facilita la diferenciación de dichos fragmentos amplificados además de permitir la lectura de señales por parte del equipo de electroforesis capilar (Bolívar, Rojas y García, 2014; Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Así, cuando se cuenta con las amplificaciones de la reacción de PCR Múltiple, se realiza una lectura de los resultados por medio de electroforesis capilar acoplado a fluorescencia, en este proceso, se utiliza un patrón de tamaño que permite la comparación de las señales obtenidas de los marcajes fluorescentes incluidos con cada par de imprimadores con un estándar, y de esta manera se puede tanto definir la cantidad de pares de bases de cada fragmento como observar su concentración de acuerdo con la intensidad de cada señal. Además, es posible identificar las repeticiones de los microsatélites (Checa *et al.*, 2000).

Estos microsatélites consisten en conjuntos de pares de bases que se repiten secuencialmente en el ADN del individuo de estudio, y la cantidad de repeticiones obtenidas constituyen distintos alelos, y que pueden, o no, producir respuestas fenotípicas distintas entre individuos de la misma especie (Wenne, 2023). La cuantificación y diferenciación de la presencia o ausencia de estos alelos permite realizar el proceso de genotipado, que para cada individuo va a determinar el conjunto de alelos que se encuentran en su genotipo y, por lo tanto, es una herramienta de diferenciación de alta fidelidad (van der Lee *et al.*, 2020; Verlouw *et al.*, 2021).

Así, con el uso de marcadores microsatélite es posible generar una huella genética o “fingerprint” que tiene varias aplicaciones como el análisis de relación entre muestras mediante la comparación de patrones genéticos, además de brindar información valiosa para aplicaciones en programas de mejoramiento genético como la identificación de individuos, determinar grados de parentescos y su diversidad (Krüger y Schleinitz, 2017).

Posteriormente, los datos del genotipado de cada uno de los individuos pueden ser utilizados para la realización de análisis poblacionales, que son capaces de describir la distribución y el comportamiento de las variantes dentro de una misma especie ya sea con la presencia o ausencia de una estratificación o bien de separación geográfica.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo general de este proyecto fue determinar la diversidad genética de germoplasma disponible de *Hevea brasiliensis* en Costa Rica mediante el uso de marcadores moleculares microsatélite.

Con el fin de lograr lo anterior, se presentaron los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar un conjunto de nueve marcadores microsatélites con alto nivel de polimorfismo y compatibles para un arreglo de PCR Múltiplex.
2. Optimizar el método de amplificación por PCR Multiplex de nueve microsatélites y su análisis con electroforesis capilar acoplada a fluorescencia.
3. Analizar la diversidad genética de seis sitios de colecta con presencia de árboles de *Hevea brasiliensis* en Costa Rica.

Capítulo 3

Determinación de la diversidad genética de germoplasma introducido en Costa Rica con marcadores microsatélites del árbol de hule (*Hevea brasiliensis* Willd. Ex a. Juss) para el cultivo comercial

Determination of the genetic diversity of introduced germplasm in Costa Rica using microsatellite markers of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Willd. ex A. Juss) for commercial cultivation

David Araya-Gutiérrez^a, Emmanuel Araya-Valverde^{b,c}, Dawa Méndez-Álvarez^c, Dagoberto Arias-Aguilar^c, Mariangel Murillo-Campos^d, Nelson Zamora-Villalobos^c.

a. Área Académica Agroforestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. e-mail: davidaraya53@gmail.com (DAG).

b. Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, Centro Nacional de Alta Tecnología. San José, Costa Rica. e-mail: earaya@cenat.ac.cr (EAV).

c. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. e-mail: damendez@itcr.ac.cr (DMA), darias@itcr.ac.cr (DAA), nzamora@itcr.ac.cr (NZV).

d. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. e-mail: mariangel@estudiantec.cr (MMC).

Autor por correspondencia: Emmanuel Araya-Valverde^{b,c}. e-mail: earaya@cenat.ac.cr

Palabras clave: árbol de caucho, análisis de fragmentos, PCR Múltiplex, electroforesis capilar, SSRs.

Resumen

El árbol de hule (*Hevea brasiliensis*) tiene sus orígenes en Brasil, sin embargo, debido al interés comercial que presenta, se ha introducido en diversos sitios del mundo, principalmente zonas tropicales, entre ellas, Costa Rica. Existe un vacío informativo en torno a la identificación de recursos genéticos a nivel nacional por lo que el presente estudio tiene el objetivo de determinar la diversidad genética de germoplasma disponible

de *Hevea brasiliensis* en Costa Rica mediante el uso de marcadores moleculares microsatélite. Se seleccionó un grupo de marcadores microsatélites a partir de otros estudios para realizar un análisis genético de la distribución de genotipos de hule en Costa Rica, con 122 individuos provenientes de seis sitios en las provincias de Limón, Heredia y Puntarenas, a los que se extrajo ADN y se amplificaron con PCR Múltiplex para posteriormente ser analizados por medio de electroforesis capilar, con lo que se obtuvo una división en tres grupos que no denotan una estructura poblacional muy definida. Los marcadores son altamente informativos y suficientes para el estudio, y en el caso de las muestras por sitio, se muestra una alta heterocigosidad intra- e inter-sitios, probablemente producto de la distribución que se realizó en el momento de la introducción de la especie al país. Así, se concluye que la especie presenta una diversidad alta, sin embargo, hay varias similitudes genéticas entre los sitios, siendo El Cairo un sitio de especial interés debido a que es el que presenta las mayores diferencias respecto a los demás.

Keywords: rubber tree, fragment analysis, multiplex PCR, capillary electrophoresis, SSRs.

Abstract

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) originates from Brazil; however, due to its commercial importance, it has been introduced to various parts of the world, primarily tropical regions, including Costa Rica. There is a lack of information regarding the identification of genetic resources at the national level. This study aims to determine the genetic diversity of the available *Hevea brasiliensis* germplasm in Costa Rica using microsatellite molecular markers. A set of microsatellite markers was selected based on previous studies to perform a genetic analysis of the distribution of rubber tree genotypes in Costa Rica. The study analyzed 122 individuals from six sites across the provinces of Limón, Heredia, and Puntarenas. DNA was extracted from these individuals and amplified using multiplex PCR, followed by capillary electrophoresis analysis. The results identified three groups that did not show a clearly defined population structure. The markers used were highly informative and sufficient for the study. For samples by site, high intra- and inter-site heterozygosity was observed, likely a result of the distribution patterns during the species' introduction to the country. The findings conclude that the species exhibits high genetic

diversity. However, there are several genetic similarities among the sites, with El Cairo standing out as a site of special interest due to its greater genetic differentiation compared to the others.

Introducción

Hevea brasiliensis, conocido comúnmente como árbol de hule o de caucho, es una especie nativa de la región amazónica en Brasil. Aunque su origen está en América del Sur, en la actualidad su cultivo ha sido ampliamente distribuido y se desarrolla en zonas tropicales, principalmente en la región de Asia, donde se han encontrado condiciones ideales para su crecimiento y la producción del látex natural (Nair, 2020).

Existen registros de la presencia de este árbol en Costa Rica desde mediados del siglo XIX (Sell 2021). Entre los años 1940 y 1954 se realizó el proyecto impulsado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos denominado “El Proyecto Cooperativo de Hule (The Cooperative Rubber Project) para América Latina”, en el cual se incluyó a Costa Rica como estación experimental introduciendo material. Así mismo, con los esfuerzos de la empresa Goodyear Rubber Plantations Co. se introdujo material de hule en 1935, sin embargo, este fue gravemente afectado por el hongo “microciclos” que afecta a nivel de la hoja (Rands y Polhamus, 1955). Además, según Townsend (1960) alrededor del año 1945 hubo intercambios de material de hule entre Costa Rica, Sri Lanka, Malasia y Brasil, lo que es un posible indicador de la procedencia del material existente en el país.

Hevea brasiliensis tiene diversos usos y aplicaciones, adicional a la extracción del látex, la madera del hule presenta características apreciables para su aprovechamiento (Owoyemi, Adamolekun y Aladejana, 2018) o su acción efectiva en contra del cambio climático (López *et al.*, 2016) ya que la longevidad del árbol puede permitir que tanto en tronco como en ramas y la sección aérea del árbol se almacenen grandes cantidades de carbono mediante la fijación del mismo (Zavala *et al.*, 2019). Además, en países como Costa Rica, la industria que importa y consume materia prima del hule para la producción de plásticos y caucho, en 2019 generó empleo para 12 183 personas (COMEX, 2022), lo que posiciona a la especie como un posible vehículo de reactivación económica en zonas

rurales gracias a la existencia de un mercado definido, a la vez que se puede aprovechar su cultivo en arreglos de sistemas silvopastoriles y agroforestales

Debido a su importancia, existe una gran cantidad estudios en torno al recurso genético del hule, lo que incluye algunos análisis poblacionales que describen su estructura y diversidad mediante SSRs y RFLP (Küpper *et al.*, 2012; Besse *et al.*, 1994), son importantes para la creación de bancos de germoplasma y resistencia a condiciones climáticas (Tian *et al.*, 2024), investigaciones en mejoramiento para características morfológicas (de Castro *et al.*, 2021), entre otros ensayos que han permitido ampliar el conocimiento en torno a las características genéticas de la especie, por ejemplo, se han realizado amplios estudios en la utilización de microsátélites para la identificación de hule en distintas regiones, generando así una base de datos de marcadores que es posible utilizar para replicar dichos trabajos (Bindu y Nazeer, 2005; Lima *et al.*, 2010; Silva, Oliveira y Campos, 2022; Souza *et al.*, 2009; Bachega *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2021).

Sin embargo, este conocimiento sigue siendo limitado, incluso en regiones donde su cultivo se ha expandido, como las zonas tropicales de Asia, África y América Latina, ya que hay pocos estudios profundos sobre las variedades o clones cultivados, como resultado, muchas de estas variedades carecen de certificación, así como de registros genéticos o accesiones formales, lo que dificulta el seguimiento y control de los clones de hule en estos lugares (Silva, Oliveira y Campos, 2022).

Los registros históricos no permiten precisar cómo se distribuyó *Hevea brasiliensis* entre países, dificultando la diferenciación de genotipos en Costa Rica, por esto, la identificación genética mediante técnicas moleculares se presenta como una herramienta clave para caracterizar sus poblaciones. Sin embargo, en el país no existen estudios científicos ni datos sobre la variabilidad genética de esta especie, lo que limita su manejo y aprovechamiento.

Con lo anterior, realizar estudios genéticos de *H. brasiliensis* en Costa Rica (y en otras regiones de poco estudio) es muy importante para mejorar la posibilidad de utilizar el árbol de hule como un impulsor de la economía en sistemas integrales que utilicen el conocimiento científico generado para el mejoramiento de los métodos productivos y que, por ende, aumente su rentabilidad. Así, el objetivo del presente estudio consistió en

determinar la diversidad genética de germoplasma disponible de *Hevea brasiliensis* en Costa Rica mediante el uso de marcadores moleculares microsatélite, esto con el fin de disponer de una descripción genética que permita un mejor aprovechamiento a futuro.

Metodología

La investigación se realizó a partir del mes de febrero de 2023 y finalizó en el mes de septiembre de 2024. La selección de imprimadores, el almacenamiento de las muestras y las extracciones de ADN se realizaron en el Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede Central, Cartago (ITCR). La cuantificación del ADN, las reacciones de PCR, y el análisis estadístico se realizaron en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT). El análisis de fragmentos se realizó en el CENIBiot-CeNAT y en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA).

Colecta de muestras

Se ubicaron 6 sitios en el país con la presencia de germoplasma de *H. brasilienses* (Figura 1). Los sitios El Cairo y Guápiles eran remanentes de plantaciones plantadas hace décadas, el Jardín Clonal es más reciente con material clonal traído de Guatemala, La Tirimbina correspondió a individuos encontrados en área protegida, y los otros sitios son Potrero Grande, y Los Gavilanes eran plantaciones también establecidas décadas atrás. Las condiciones climáticas de cada sitio se observan en el Cuadro 1.

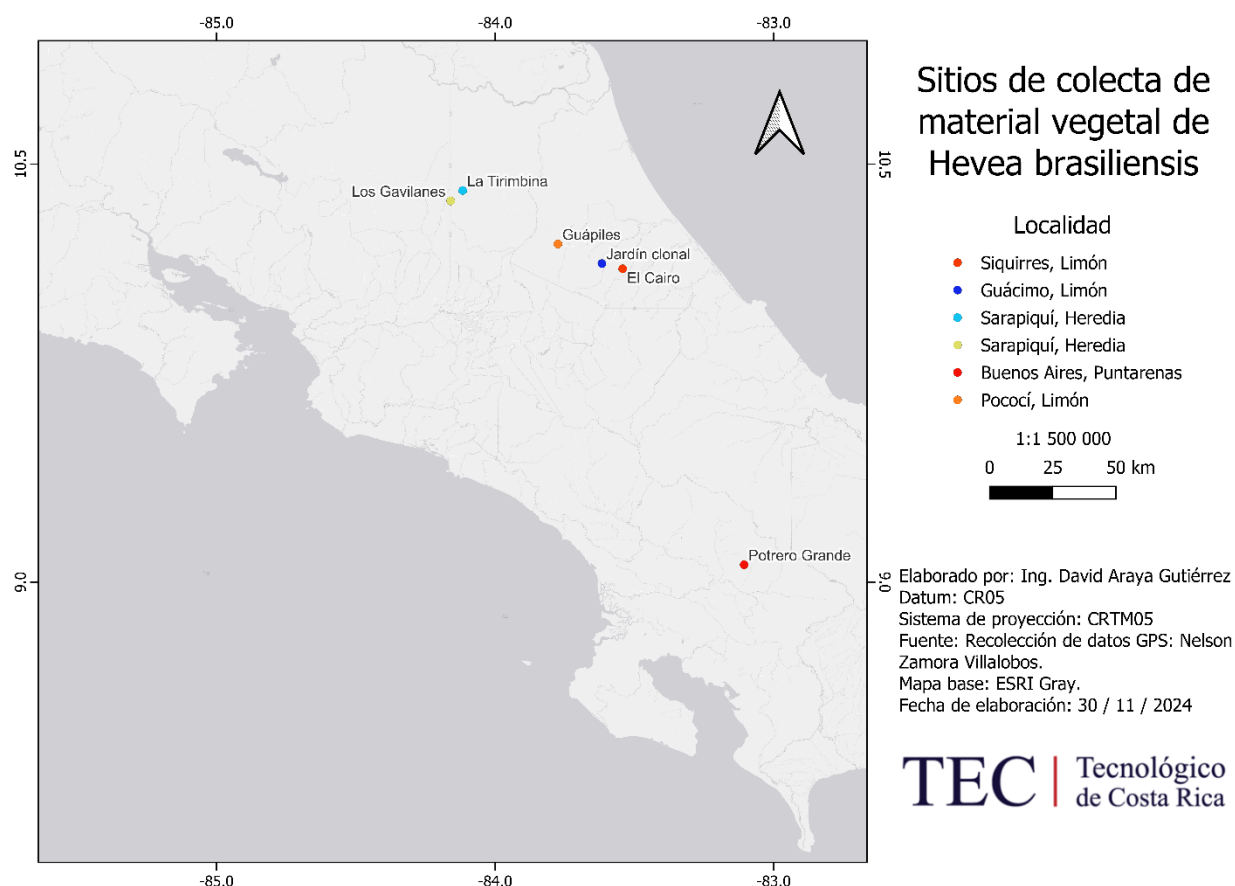


Figura 1. Mapa de ubicación geográfica de los sitios de muestreo de individuos de *Hevea brasiliensis*.

Cuadro 1. Información de los sitios de colecta y cantidad de muestras provenientes de cada uno. Datos de Precipitación media anual y humedad relativa según el Sistema Nacional de Información Territorial.

Sitio	Coordenadas	Elevación (m)	Cantidad de muestras	Precipitación media anual (mm)	Humedad relativa (%)
La Tirimbina	10° 24' 18,1" N, 84° 06' 59,2" W	223	19	3500 – 4000	80 – 90
Los Gavilanes	10° 22' 03,8" N, 84° 09' 34,2" W	304	17	3500 – 4000	80 – 90
Guápiles	10° 12' 47,1" N, 83° 46' 29,3" W	267	20	3500 – 5000	> 80
Jardín clonal	10° 8' 35,37" N, 83° 37' 0,76" W	204	17	3500 – 3800	85 – 95
El Cairo	10° 07' 28,1" N, 83° 32' 32,2" W	114	22	3500 – 3800	85 – 95
Potrero Grande	09° 03' 44,5" N, 83° 06' 22,6" W	746	27	3500 – 5000	80 – 95

En cada sitio se seleccionó de forma aleatoria un grupo de árboles (Cuadro 1) según la accesibilidad, el cuadro detalla la cantidad de muestras que fueron efectivamente utilizadas, descartando algunas que mostraron deterioro o bien, que no presentaron concentración y pureza de ADN adecuados luego de las extracciones. De cada árbol se colectó dos a tres hojas y se colocaron en tubos de 50ml con sílica desecante (Merk, Alemania) hasta su traslado al Laboratorio de Genética Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal de la Escuela de Ingeniería Forestal del ITCR. Posteriormente las muestras se colocaron en sobres de papel con sílica a 40°C por 24 horas y se almacenaron hasta su procesamiento.

Selección de imprimadores.

Para la identificación de los marcadores microsatélites inicialmente se realizó una revisión de literatura en la que se utilizó la base de datos Web of Science™ con los términos “rubber tree”, “microsatellite”, “*Hevea brasiliensis*”, “*Hevea*”, “SSR”, “STR”, “genetic diversity” en una búsqueda con términos en todos los campos (All Fields) y operadores no exclusivos OR entre cada uno de los términos de búsqueda. Se realizó una limpieza de los resultados obtenidos para descartar los estudios que no hicieran referencia al uso de microsatélites en árbol de hule, y a partir de la literatura restante se continuó con la recopilación de la información sobre los marcadores.

La información se organizó en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® conteniendo columnas de información referidas a: Nombre del Locus, Acceso de Genbank, Imprimador Forward, Imprimador Reverse, Motivo de secuencia, Rango y tamaño de alelos, Temperatura de alineamiento, Número de alelos, Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), Contenido de información polimórfica (PIC), Tipo de electroforesis utilizada, Referencia bibliográfica.

A partir de los recursos obtenidos se seleccionó un grupo de imprimadores de acuerdo con los parámetros mencionados en el párrafo anterior, mediante los cuales se buscó imprimadores altamente informativos, esto considerando la posible compatibilidad para el establecimiento de arreglos en PCR Múltiplex según el ámbito y tamaño de alelos, y la temperatura de alineamiento.

Del grupo de imprimadores seleccionados, se organizaron tres arreglos de PCR Múltiplex con cuatro, tres y dos imprimadores cada uno, y adicionalmente, a cada marcador se asignó un fluoróforo azul, verde o amarillo, FAM, VIC o NED respectivamente, de manera tal que los imprimadores con rangos cercanos presentaran un marcaje de color distinto para poder diferenciarlos de manera adecuada (cuadro 2, cuadro 3).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se pesó 50 mg de hojas secas y se maceró con perlas de cerámica en macerador FastPrep (MP Biomedicals, USA), se agregó 800 µl de buffer de extracción (100mM Tris HCl, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2% (m/v) CTAB, 2% (m/v) PVP, 2% (m/v) β-mercaptoetanol), se agitó en vórtex por 10 segundos y se incubó los tubos en baño maría a 65°C durante 40 minutos con una agitación cada 10 minutos. Se transfirió 750µl del contenido a un nuevo tubo, se agregó 750µl de Cloroformo-Octanol (24:1) y se mezcló invirtiendo los tubos 20 veces, se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, luego de esto se extrajo 300µl de sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo.

Se agregó un volumen de isopropanol a -20°C y se mezcló invirtiendo los tubos 20 veces, se dejaron los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregó 500µl de etanol 70% a -20°C, se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm y luego se descartó el etanol, el residuo de etanol se secó colocando los tubos en una estufa a 42°C durante 30 minutos.

Una vez se secó el etanol, se resuspendió el pellet con 100µl de buffer TE con ARNasa (50:1) y se incubó los tubos en baño maría a 37°C durante 30 minutos. Se resuspendió en vórtex por 2 segundos y se almacenó a -20°C. Luego se transportaron las muestras en hielera al CENIBiot y se realizó la cuantificación de ADN en NanoDrop de Thermo Fisher Scientific.

Amplificación por PCR Multiplex

La optimización del procedimiento se realizó a partir de 17 muestras de hojas obtenidas del jardín clonal de la empresa Hevea Costa Rica Desarrollos Agroforestales S.A. (Hevea CR) ubicada en Guácimo, Limón. Para la realización de la reacción de PCR Multiplex inicialmente se llevaron a cabo pruebas con tres pools de ADN compuestos por cinco

muestras cada uno para ajustar la concentración de reactivos y el programa de termociclado. La reacción consistió en un volumen de 12,5 µl de una mezcla de DreamTaq MasterMix 1X (Thermo Fisher Scientific, USA) complementado con MgCl₂ (1mM), DMSO (2,00%), BSA (0,4mg ml⁻¹), polimerasa DreamTaq (1 unidad µl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, USA), y ADN (80 ng µl⁻¹).

Los imprimadores utilizados se muestran en el cuadro 2 mientras que su concentración, el tipo de fluorocromo y en cual multiplex se agrupó se muestra en el cuadro 3. Además, se evaluó la interacción de los distintos imprimadores en cada reacción de PCR Múltiplex. Para definir el programa de termociclado se realizaron varias pruebas de temperatura de alineamiento con la función Veriflex del termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems, USA)

Cuadro 2. Imprimadores seleccionados para la amplificación por PCR Multiplex.

Imprimador	Accesión en Genbank	Secuencia 5'-3'	TA (°C)	Referencia
HB-17 F HB-17 R	FJ919795	AGGGCTTCGGGACAATCA GACATATGCCCCAACAAGT G GCCAAATCAATCACTCATC	60	Souza <i>et al.</i> (2009)
HB-24 F HB-24 R	FJ919801	C GTGCTTCGGCTCAATCTGT T	60	Souza <i>et al.</i> (2009)
HB-29 F HB-29 R	FJ919805	AGAAACATGCAAGGGAAC AC AGCGGACATACGAAGGAA TATTTGCTGTTGGAGGAAG	56	Souza <i>et al.</i> (2009)
HBE-001 F HBE-001 R	EC609907	AA CACCAATCAATAATCACCA AGA	54,4	Küpper <i>et al.</i> (2012)

HBE-014 F	EC609118	TCTAAGGATGGTTTCCGAC	55,4	Küpper <i>et al.</i> (2012)
HBE-014 R		G		
		ATAGCCCCAACCCCATTG		
		AGCTGGTGCAAACATCCT		
HBE-017 F	EC608908	G	55,4	Küpper <i>et al.</i> (2012)
HBE-017 R		CGTTCCTCCAAAAGTTATT		
		CAA		
		CTAACATAGTTGGTGGTTG		
HBE-167 F	EC603048	TGG	57	Küpper <i>et al.</i> (2012)
HBE-167 R		GGATATTTTGCAGACCCAG		
		AC		
		GGACTAAAACGATCTAATG		
IAC-HV06 F	AY486741	CTA	58	Lima <i>et al.</i> (2010)
IAC-HV06 R		AAGAGTCTGTGATGGAGT		
		GAAG		
		TCAGGGGAGATTATTTAGT		
IAC-HV70 F	AY486725	TGT	61,8	Lima <i>et al.</i> (2010)
IAC-HV70 R		GCAGGATGGAAGGGTGAG		

TA, temperatura de alineamiento.

Cuadro 3. Tinción, concentración final y reacción múltiplex respectiva para cada uno de los microsatélites utilizados.

Microsatélite	Tinción fluorescente	Concentración final (μM)	Reacción Multiplex
HB-29	VIC	0,150	1
HB-17	FAM	0,075	1
IAC- HV70	VIC	0,125	1
HBE-001	FAM	0,200	2
HBE-014	NED	0,125	2
HBE-017	VIC	0,175	2
HB-24	FAM	0,100	2
IAC-HV06	NED	0,175	3
HBE-167	VIC	0,080	3

Se utilizó el mismo programa de termociclado para las tres reacciones, la desnaturalización inicial se realizó a 95°C durante 5 minutos; luego se realizó 35 ciclos cada uno compuesto por un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 54°C por 30 segundos y un tercer paso de elongación a 72°C por 1 minuto; finalmente se realizó una etapa de elongación a 72°C durante 8 minutos y se mantuvo los productos de PCR a 4°C. Una vez optimizado el proceso con los 17 individuos iniciales, se realizó para la totalidad de las muestras.

Análisis de fragmentos

El análisis de fragmentos se realizó en el Secuenciador ABI SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) con el patrón de tamaño GeneScan (TM) LIZ-600 (Thermo Fisher Scientific, USA) en una mezcla de Formamida-LIZ600 (43:2). Los productos de

PCR se mezclaron con la solución Formamida-LIZ600 en placas de 96 pozos, la placa se centrifugó a 2000 g durante 30 segundos para eliminar burbujas y luego se realizó un choque térmico colocando la placa en el termociclador a 96°C durante 5 minutos e inmediatamente se colocaron en bloque frío a -2°C por 2 minutos. Posteriormente se realizó la electroforesis capilar. La visualización de los resultados y su genotipado se realizaron en el software GeneMapper V,6,0. (Applied Biosystems, USA)

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos del genotipado se realizó utilizando Microsoft Excel® V,2405 con el complemento GenAIEx V,6,5 para determinar, respecto a los marcadores, el número de alelos efectivos, la heterocigosidad observada y esperada, la probabilidad de exclusión, la probabilidad de identidad y los estadísticos F, datos útiles para determinar la efectividad de los microsatélites en la determinación de diversidad genética y datos de diversidad propiamente. Adicionalmente, para el análisis por sitio se obtuvo los parámetros sobre el número de alelos y alelos efectivos, la heterocigosidad y la distancia genética de Nei, que fueron utilizados para determinar la diversidad entre sitios.

Mediante el software Power Marker V,3,25 se calculó el valor del PIC para cada marcador, el cuál es un indicador de variación alélica en el estudio. Y el protocolo estadístico para análisis genéticos Population genetics and genomics in R de Grünwald *et al*, (2017) se utilizó para la creación del árbol filogenético, la determinación de agrupamientos, y el análisis discriminante de componentes principales para comprender la distribución poblacional de las muestras.

Resultados y Discusión

Capacidad informativa de los microsatélites

En los cuadros 4 y 5 se muestran datos de los diferentes marcadores. Con todos los individuos se identificó un total de 68 alelos para los 9 microsatélites. El número de alelos presentó una variación desde los 3 para el locus HBE-017 hasta 12 para los locus IAC-HV06 y HBE-001, brindando un promedio de 7,56 alelos por locus, valor que es ligeramente mayor al presentado por de Souza *et al*. (2009) en una población de 31 individuos utilizando un total de 27 marcadores con un promedio de 6,22 alelos por locus

y al estudio de Lima *et al.* (2010) que obtuvieron en promedio 6,03 alelos por locus en una población de 60 individuos utilizando 64 microsatélites.

Además, el contenido de información polimórfica es altamente informativo (>0.5) para los marcadores HB-17, HB-24, HB-29, HBE-001, HBE-167, IAC-HV06, e IAC-HV70, mientras que para los marcadores restantes HBE-014, y HBE-017 fue moderadamente informativo (>0.3), estos rangos de valores de acuerdo con lo mostrado por Tian *et al.*, (2024).

Cuadro 4. Estadísticas de diversidad genética estimadas para cada locus en la población de *Hevea brasiliensis*.

Locus	Na	Ne	Ho	He	F _{is}	F _{st}	PIC
HB-17	7	2,730	0,746	0,631	-0,184	0,102	0,738
HB-24	5	2,490	0,610	0,585	-0,043	0,148	0,626
HB-29	9	2,862	0,723	0,634	-0,141	0,102	0,680
HBE-001	12	4,739	0,699	0,759	0,079	0,084	0,806
HBE-014	6	1,638	0,385	0,359	-0,072	0,092	0,384
HBE-017	3	1,701	0,577	0,398	-0,449	0,074	0,339
HBE-167	4	2,422	0,720	0,574	-0,256	0,130	0,596
IAC-HV06	12	4,116	0,630	0,726	0,131	0,121	0,803
IAC-HV70	10	3,212	0,651	0,682	0,045	0,107	0,736

Na, número de alelos; Ne, número de alelos efectivos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; F_{is}, coeficiente de endogamia de Wright; F_{st}, índice de fijación de Wright; PIC, contenido de información polimórfica.

También se observan los datos de probabilidad de exclusión y probabilidad de identidad en el cuadro 5, en relación con la cantidad de marcadores tomados en cuenta para el análisis, de esto se tiene que la probabilidad de exclusión supera un valor de 99,99% al utilizar todos los marcadores, mientras que la probabilidad de identidad es menor a 0,001% con el uso de cuatro o más marcadores. Los datos anteriores indican que este arreglo de microsatélites efectivamente es suficiente para determinar con certeza los parámetros de diversidad genética discutidos en el presente estudio a la vez que se utilizan reacciones de PCR múltiplex, lo que permite optimizar el uso de recursos y tiempo.

Cuadro 5. Probabilidad de exclusión e identidad para el análisis con un número ascendente de marcadores microsatélite SSRs.

N° SSRs	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PE	0,6292	0,8949	0,9752	0,9898	0,9984	0,9988	0,9993	0,9997	0,9999
PI	0,14	0,016	0,0013	0,0002	1,1 x 10 ⁻⁵	4,5 x 10 ⁻⁶	1,7 x 10 ⁻⁶	3,0 x 10 ⁻⁷	1,6 x 10 ⁻⁸

PE, probabilidad de exclusión; PI, probabilidad de identidad.

Diversidad genética de Hevea brasiliensis

De acuerdo con el cuadro 4, el valor de la heterocigosidad esperada presenta un rango desde 0,359 en el locus HBE-014 hasta 0,759 en HBE-001, siendo el promedio un valor de 0,594, mientras que el valor de la heterocigosidad observada presenta un rango desde 0,385 en el locus HBE-014 hasta 0,746 en HB-17, siendo el promedio un valor de 0,638. Se puede observar que en general, la heterocigosidad observada fue mayor a la esperada, a excepción de los marcadores IAC-HV06, IAC-HV70 y HBE-001. En este sentido, se tiene una población de muestras con una diversidad alta entre los distintos sitios de estudio. Contrario a lo reportado por Tian *et al.* (2024) que realizaron un estudio en China y la heterocigosidad fue baja. Por otro lado, Silva, Oliveira y Campos (2022) realizaron un estudio con 10 microsatélites y obtuvieron una Ho de 0,60, muy cercana al valor obtenido en este estudio.

Los datos de diversidad por sitio se muestran en el cuadro 6, donde el número de alelos es muy regular para todos los sitios, entre 4 y 6, mientras que el número de alelos efectivos se encuentra entre 2 y 4. En el caso de la diversidad mediante el dato de la heterocigosidad, los valores se encuentran entre 0,556 para Potrero Grande y 0,614 para La Tirimbina, con los valores menor y mayor respectivamente, mostrando así todas las poblaciones una alta diversidad, esto corresponde con el estudio de Lima *et al.*, (2010) en el que se utilizó individuos de una colección (similar al sitio del Jardín Clonal) y de campo, para los que también se tuvo una alta diversidad en el caso de los genotipos americanos.

Cuadro 6. Estadísticas de diversidad genética estimadas para cada sitio en la población de *Hevea brasiliensis*.

Sitio	Na	Ne	He
Jardin clonal	4,889	3,122	0,611
La Tirimbina	5,667	2,847	0,614
Los Gavilanes	4,889	2,827	0,561
GUÁPILES	4,667	2,778	0,613
El Cairo	5,333	3,048	0,609
Potrero Grande	4,111	2,650	0,556

Na, número de alelos; Ne, número de alelos efectivos; He, heterocigosidad esperada.

Estructura de Hevea brasiliensis en Costa Rica

Respecto a la estructura, según el coeficiente de endogamia (cuadro 4) se observan valores en su mayoría negativos o bien, bajos, lo que indica que la población muestra un comportamiento mayormente heterocigoto, reforzando así los resultados anteriores. Esto corresponde con lo estudiado por de Paiva, Kageyama y Vencovsky (1993) que indican encontrar valores de endogamia bajos, incluso negativos, lo que puede significar que estos resultados se aproximan a cero y por lo tanto, sería bueno utilizar una mayor cantidad de muestras para analizar el marcador con estos valores. Mientras tanto, el índice de fijación también presenta valores bajos, lo que indica muy poca estructura, con pocas diferencias en las frecuencias alélicas entre los sitios de estudio.

En el caso de la distancia genética, en el cuadro 7 es posible observar que la menor y la mayor distancia se asocian al sitio de Potrero Grande con el Jardín clonal y La Tirimbina respectivamente, también hay valores pequeños de distancia genética entre Los Gavilanes con Potrero Grande y el Jardín clonal, mientras que se observan distancias genéticas mayores para Potrero grande respecto a La Tirimbina, El Cairo y Guápiles, y de El Cairo respecto a Los Gavilanes.

Cuadro 7. Distancia genética de Nei para los sitios de colecta de *H. brasiliensis*. A mayor valor, mayor distancia genética. Rojo, distancia nula; naranja, poca distancia; amarillo, distancia media; verde, alta distancia.

Jardín clonal	La Tirimbina	Los Gavilanes	Guápiles	El Cairo	Potrero Grande	
0,000						Jardín clonal
0,274	0,000					La Tirimbina
0,096	0,250	0,000				Los Gavilanes
0,278	0,201	0,203	0,000			Guápiles
0,289	0,185	0,299	0,264	0,000		El Cairo
0,059	0,413	0,132	0,363	0,367	0,000	Potrero Grande

Además, en la figura 2 se observa una disminución significativa en la pendiente de la línea luego de tres grupos, lo que indica que tres es el número más adecuado para el agrupamiento de las muestras. Mientras tanto, estos grupos pueden organizarse en subgrupos tal como se visualiza en el árbol filogenético de la figura 3, el cual describe la distribución de los individuos.

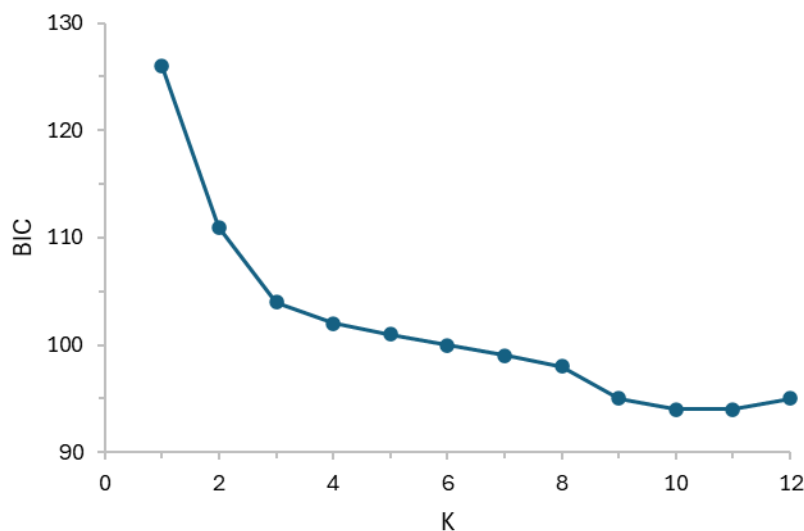


Figura 2. Gráfica de dispersión de BIC (bayesian information criterion) versus K (número de grupos apropiados para los datos).

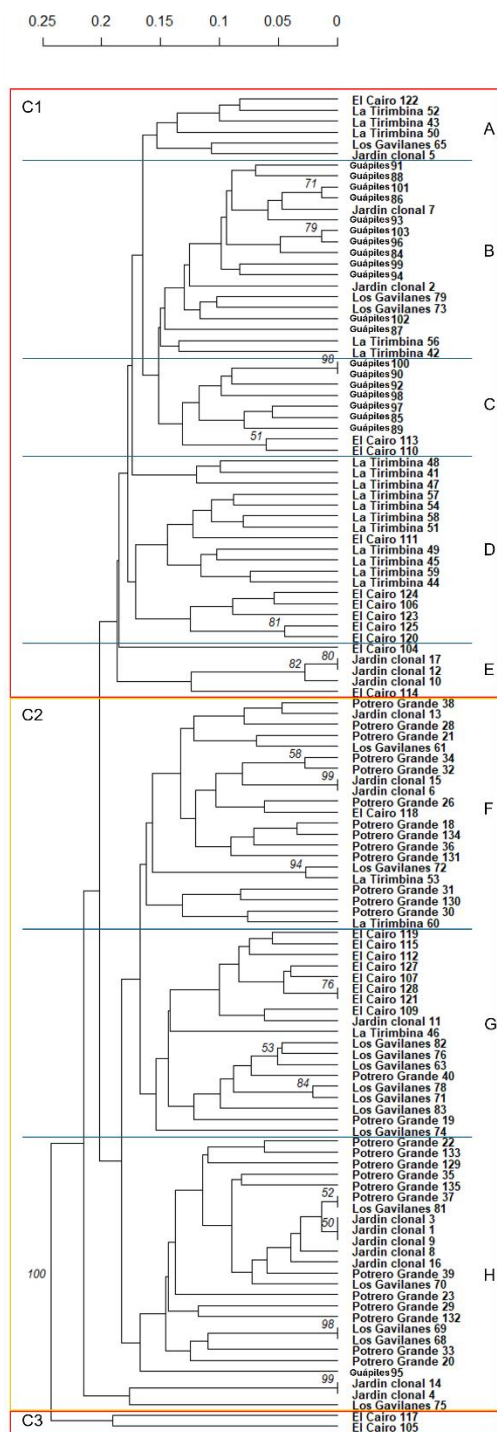


Figura 3. Distribución filogenética de individuos muestreados por sitio y distribución en tres grupos, C1 (subgrupos A, B, C, D, E), C2 (subgrupos F, G, H), y C3. Los recuadros rojos y amarillos separan cada grupo, las líneas azules separan los subgrupos.

De lo anterior, se observa una distribución en tres grupos principales, de ellos, el C1 presenta individuos de todos los sitios excepto de Potrero Grande en Buenos Aires de Puntarenas, y dentro de los subgrupos se observa que hay muestras de El Cairo en A, C, D, y E, siendo este el sitio con mayor presencia entre subgrupos; también se observa que las muestras del Guápiles se agrupan únicamente en B y C, siendo el mayor componente de cada uno, mientras tanto, las muestras de Jardín clonal se encuentran en A, B, y E, las de La Tirimbina en A, B, y las muestras de Los Gavilanes se encuentran en A y B.

El grupo C2 incorpora individuos de todos los sitios, sin embargo, del Guápiles solo se presenta una muestra en el subgrupo H, y no hay muestras de La Tirimbina. F y G presentan muestras de todos los sitios a excepción de Guápiles, observándose en el F una gran cantidad de individuos de Potrero Grande y en el G muchos de El Cairo y Los Gavilanes. Mientras tanto, el grupo C3 se ve conformado únicamente por dos individuos correspondientes al sitio de El Cairo.

De la distribución descrita y al observar la figura 4, se evidencia una gran mezcla en tanto dentro de los grupos como de los subgrupos, lo que resulta en poca estructura, reforzando así lo discutido anteriormente, esto pudiendo estar relacionado con la forma en que se dio la introducción de la especie al país y su posterior distribución desde los centros de investigación, así como para la etapa productiva, tal como lo describen Rands y Polhamus, 1955, y Townsend, 1960.

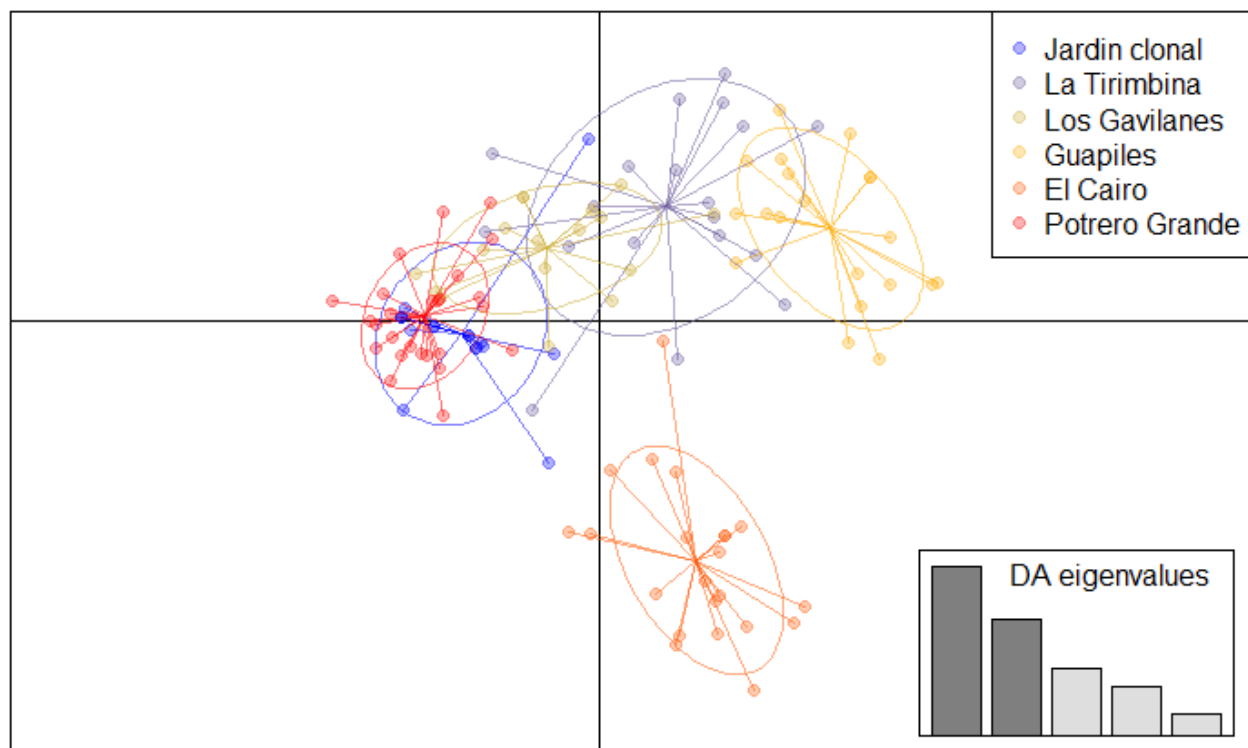


Figura 4. Análisis discriminante de componentes principales (ADCP) para 122 muestras de *H. brasiliensis* colectadas de 6 sitios distintos. DA eigenvalues, valores propios del análisis discriminante.

Los individuos pertenecientes al sitio de El Cairo, son los que presentan una mayor independencia en el ADCP, lo que es interesante considerando su cercanía con Guápiles dado que esto es un indicativo de que en la distribución de hule en Costa Rica, la cercanía geográfica no implica una similitud genética. Por otro lado, el sitio de Potrero Grande, que no se presentó en el C1, denota una clara separación de los sitios La Tirimbina y Guápiles.

Se observa además que contrario a lo esperado, el sitio con mayor distancia geográfica de los demás, que corresponde a Potrero Grande, genéticamente se encuentra en una posición cercana a los sitios de Los Gavilanes y el Jardín clonal, incluso un poco con La Tirimbina, esto puede deberse a que el material introducido a Costa Rica comenzó por la estación experimental ubicada en Turrialba y a partir de esta cooperación se comenzó a dar la distribución a los distintos puntos del país con fines de investigación y productivos, por lo que estos remanentes de hule pueden responder a una distribución de material similar.

Además, se observó que el jardín clonal fue el sitio con mayor presencia de clones, dato esperable por ser muestras de un sitio dedicado a la mantención de distintos clones. También se identificaron individuos con el mismo genotipo en los sitios de Los Gavilanes, Guápiles, El Cairo y Potrero Grande, de estos, los sitios de Guápiles y El Cairo son cercanos, por lo que puede ser esperable que haya material compartido entre ellos, pero especialmente es de interés la identificación de dos individuos pertenecientes a los sitios Los Gavilanes y Potrero Grande que mostraron ser clones, con esto, la presencia de clones entre dos de las zonas más alejadas es una evidencia de que se tuvo algún tipo de distribución del material introducido al país, y de la relación que hay entre los distintos sitios de muestreo. Únicamente el sitio de La Tirimbina no mostró clones.

Conclusiones

A partir del estudio se concluye que la distribución de genotipos de hule en los sitios muestreados es altamente diversa, hay registros de cómo se comenzó a dar la introducción del material a Costa Rica focalizada en Turrialba a través del Proyecto Cooperativo de Hule y su posterior distribución con fines investigativos o comerciales, posible razón de que la mayoría del material se puede encontrar en distintos puntos del país, esto exceptuando la gran diferenciación encontrada para el sitio de El Cairo, el cual es un sitio que al momento de generar nuevos esfuerzos para la conservación o el estudio de características comerciales del hule, deberá ser tomado en cuenta.

Por otra parte, ante la falta de análisis genéticos de *H. brasiliensis* en Costa Rica, el presente estudio es un primer paso para la conservación, pero también para el aprovechamiento comercial de esta especie considerando aspectos genéticos que con futuros estudios puedan incluso beneficiar la utilización de individuos con características agronómicas superiores mediante el aprovechamiento en programas de mejoramiento con distintos enfoques, ya sea buscar individuos similares con miras hacia la producción de genotipos homocigotos para mantener características o bien, la mezcla entre sitios que presentan diferencias genéticas para inducir a la variabilidad genética y en ambos casos, buscar características agronómicamente destacables en las plantas productivas.

Declaraciones

Aprobación ética y consentimiento para participar. No aplica.

Consentimiento para publicación. No aplica.

Disponibilidad de datos y materiales. Los datos se encuentran disponibles mediante solicitud a los autores.

Conflictos de intereses. Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Fuentes de financiamiento. Este proyecto fue financiado por el programa de becas CENAT-CONARE a través del proyecto "Diversidad genética del árbol *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss) para el cultivo comercial en Costa Rica" desarrollado en el laboratorio CENIBIOT, la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, y la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Contribuciones de los autores. NZV, DAA y DAG realizaron las colectas de material, DAG, DMA y MMC realizaron las extracciones de ADN. DAG y EAV realizaron las reacciones de PCR, los análisis de fragmentos, el genotipado y el análisis estadístico, DAG redactó el primer borrador, y todos los autores leyeron, editaron y aprobaron el manuscrito final. DAG es responsable del contenido final.

Agradecimientos. Queremos agradecer a Espinoza, R., Flores, P., Herra, V. y León, H. (Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica) por la colaboración en la colecta de muestras, a nuestra estudiante asistente de investigación (MMC) por su valiosa asistencia técnica, al programa de becas CENAT-CONARE en conjunto con su laboratorio CENIBIOT por permitir desarrollar gran parte del proyecto en sus instalaciones, y al SENASA por el apoyo mediante Bernal León (Laboratorio de Bioseguridad), y Olga Aguilar (Área de Biología Molecular) por permitir la realización de análisis de fragmentos en sus instalaciones.

Capítulo 4

Recomendaciones

Se destaca la importancia del manejo de las muestras para mantener su integridad y consecuentemente, disponer de material que permita una buena obtención del extracto genético. Adicionalmente, si se busca asociar la utilización de datos genéticos a características propias de cada genotipo ya sea en rendimientos, resistencia a enfermedades u otros aspectos forestales de interés, podrían utilizarse otros métodos de identificación que sean más informativos como es el caso de los SNPs.

También, es importante que en miras a una futura producción comercial de *H. brasiliensis* en Costa Rica, se tengan en cuenta aspectos genéticos poblacionales para los programas de selección o mejoramiento, sin dejar de lado la importancia de conservar la diversidad de germoplasma de la que se dispone actualmente.

Bibliografía

- Abu, M., Kamerkar, U., Abdul, S., Muhd, M. y Sofiman, A. (2020). Transcriptome dataset from bark and latex tissues of three *Hevea brasiliensis* clones. *Data in Brief*. 32.
- Bachega, J., Campos, C., García, D., Souza, L., Silva, C., Gazaffi, R., Silva, C., Toledo, G., Cubry, P., Garcia, A., Pereira, A. y Le Guen, V. (2018). QTL detection for growth and latex production in a full-sib rubber tree population cultivated under suboptimal climate conditions. *BMC Plant Biology*. 18(223).
- Balsiger, J., Bahdon, J. y Whiteman, A. (2000). Asia-Pacific Forestry Sector Outlook Study: The Utilization, processing and demand for Rubberwood as a source of wood supply. *FAO*. APFSOS/WP/50
- Bangham, W. (1942). Cultivo de Hevea. *Revista de Agricultura*. 16(9): 391-402.
- Besse, P., Seguin, M., Lebrun, P., Chevallier, M. H., Nicolas, D. y Lanaud, C. (1994). Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 88, 199–207.
- Bolivar, A., Rojas, A. y García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*. 3(1): 25-33.
- Castro, I., Lima, L., Martins, M., Scaloppi, E., Soares, R. y Souza, P. (2021). Genetic diversity associated with natural rubber quality in elite genotypes of the rubber tree. *Scientific Reports*. 11(1081): 1-10.
- Checa, M., Carleos, C., Baro, J., Dunner, S. y Cañon, J. (2000). Estimación de frecuencias alélicas en pools de ADN mediante el procesamiento de señales de electroforesis capilar. *ITEA*. 96(3): 225-234.
- Dairawan, M. y Shetty, P. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 8(1): 39-45.
- Grünwald, N., Kamvar, Z., Everhart, S., Tabima, J. y Knaus, B. (2017). Population genetics and genomics in R. Corvallis, Oregon, USA. Recuperado de https://grunwaldlab.github.io/Population_Genetics_in_R/
- Küpper, J., de Castro, L., Briñez, B., Scaloppi, E., de Souza, P y Benchimol, L. (2012). Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 47(8).

- Krüger, J., & Schleinitz, D. (2017). Genetic Fingerprinting Using Microsatellite Markers in a Multiplex PCR Reaction: A Compilation of Methodological Approaches from Primer Design to Detection Systems. *Genotyping*, 1–15. doi:10,1007/978-1-4939-6442-0_1
- Lima, L., Benchimol, L., Fernando, A., Zucchi, M. y Souza, P. (2010). Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2): 308-318.
- López, L., Domínguez, M., Martínez, P., Zavala, J., Gómez, A. y Posada, S. (2016). Carbono almacenado en la biomasa aérea de plantaciones de hule (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) de diferentes edades. *Madera y bosques*, 22(3), 49-60.
- Ministerio de Comercio Exterior. (2022). Estudio Sectorial: Caucho y sus manufacturas. Recuperado de <https://www.comex.go.cr/media/9439/26-caucho-y-susmanufacturas-web.pdf>
- Naciones Unidas (2015). Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Recuperado de <https://www.fundacioncarolina.es/wp-content/uploads/2019/06/ONU-Agenda-2030.pdf>
- Nair, K. (2020). Rubber (*Hevea brasiliensis*). En *Tree Crops*. Springer. 287-332.
- Owoyemi, J., Adamolekun, O. y Aladejana, J. (2018). Assessment of hygroscopic characteristics of *Hevea brasiliensis* wood. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*. 4(1): 78-91.
- Paiva, J., Kageyama, P. y Vencovsky, R. (1993). Outcrossing rates and inbreeding coefficients in rubber trees (*Hevea brasiliensis* (willd. Ex Adr. De Juss.) Müeller. Arg.). *Revista Brasileira de Genética*. 16(4), 1003 – 1011.
- Pootakham, W., Shearman, J. y Tangphatsornruang, S. (2020). Development of Molecular Markers in *Hevea brasiliensis* for Marker-Assisted Breeding. En *The Rubber Tree Genome*. Springer. 67-79.
- Rands, R. y Polhamus, L. (1955). Progress Report on the Cooperative *Hevea Rubber* Development Program in Latin America. *Field Crops Research Branch, Agricultural Research Service*.
- Saha, T., Bindu, C., y Nazeer, M. (2005). Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding*. 124: 86-92.

- Sánchez, E., Solano, W., Gatica, A., Chavarría, M. y Araya, E. (2020). Microsatellite DNA fingerprinting of *Coffea* sp. germplasm conserved in Costa Rica through singleplex and multiplex PCR. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 20(1).
- Sell, L. (2021). La extracción de caucho en Costa Rica. *Revista Herencia*. 34(1): 89-102.
- Serra, M., Cambuim, J., Kuboyama, T., Pupin, S., Alves, R., Teixeira, M., Souza, P., Sebbenn, A. y Menezes, M. (2019). Genetic diversity and structure in ex situ conserved populations of *Hevea brasiliensis*. *Scientia Forestalis*. 47(122): 346-352.
- Silva, A., Oliveira, J. y Campos, T. (2022). Evaluation of microsatellite allelic patterns to DNA fingerprinting in rubber tree clones. *Bioscience Journal*. 38.
- Souza, L., Le Guen, V., Cerqueira, C., Silva, C., Mantello C., Conson, A., Vianna, J., Zucchi, M., Scaloppi, E., Fialho, J., de Moraes, M., Gonçalves, P. y Souza, A. (2015). Genetic Diversity Strategy for the Management and Use of Rubber Genetic Resources: More than 1,000 Wild and Cultivated Accessions in a 100-Genotype Core Collection. *PLoS One*. 10(7).
- Souza, L., Mantello, C., Santos, M., de Souza, P. y Pereira, A. (2009). Microsatellites from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity analysis and cross-amplification in six *Hevea* wild species. *Conservation Genetics Resources*. 1(1): 75-79.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2): 70-78.
- Tian, M., Li, W., Luo, P., He, J., Zhang, H., Yan, Q. y Ye, Y. (2024). Genetic diversity analysis and core germplasm bank construction in cold resistant germplasm of rubber trees (*Hevea brasiliensis*). *Scientific reports*. 14.
- Townsend, C. (1960). Progress in Developing Superior *Hevea* Clones in Brazil. *Economic Botany*. 14(3).
- Trujillo, S., del Castillo, R., Tejero, D., Matias, C. y Velasco, M. (2021). DNA barcoding ferns in an unexplored tropical montane cloud forest area of southeast Oaxaca, Mexico. *Scientific reports*, 11(1).
- Van der Laat, J. (1911). Castilloa o Hevea. *Boletín de fomento*. 1(1): 11-16.

- Van der Lee, M., Kriek, M., Guchelaar, H. y Swen, J. (2020). Technologies for Pharmacogenomics: A Review. *Genes*. 11(12).
- Verlouw, J., Clemens, E., de Vries, J., Zolk, O., Verkerk, A., Zehnhoff, A., Medina, C., Lanvers, C., Rivadeneira, F., Langer, T., van Meurs, J., van den Heuvel, M., Uitterlinden, A. y Broer, L. (2021). A comparison of genotyping arrays. *European Journal of Human Genetics*. 29: 1611–1624.
- Wenne, R. (2023). Microsatellites as Molecular Markers with Applications in Exploitation and Conservation of Aquatic Animal Populations. *Genes*. 14(808).
- Zavala, J., Mansilla, L., Zavala, S. y Merino, G. (2019). Mitigación del cambio climático a través del secuestro y almacenamiento del carbono y evaluación de los servicios ambientales del SAF caucho o jebe (*Hevea brasiliensis*) y cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tingo María. *Análes Científicos*. 80(2): 462-475

